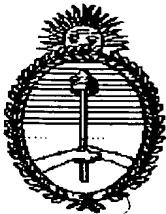


18-  
COPIA OFICIAL  
CONVENIO DE PARIS  
Lisboa 1958-

15 199/26238

REPUBLICA

ARGENTINA



REC'D 28 DEC 1999  
WIPO PCT

Ministerio de Economía  
y Obras y Servicios Públicos  
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial

0599/16238

## CERTIFICADO DE DEPOSITO

Acta N° P99.01.00679

4

El Comisario de la Administración Nacional de Patentes, certifica que con fecha 23 de FEBRERO de 1999 se presentó a nombre de BIO SIDUS S.A. CON DOMICILIO EN BUENOS AIRES, ARGENTINA

una solicitud de Patente de Invención relativa a LINEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE Y LA ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE PROducIDA POR ESTA CELULA."

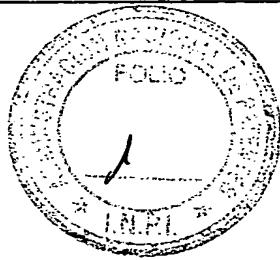
cuya descripción y dibujos adjuntos son copia fiel de la documentación depositada en el Instituto Nacional de la Propiedad Industrial.

Se certifica que lo anexado a continuación en treinta y dos fojas es copia fiel de los registros de la Administración Nacional de Patentes de la República Argentina de los documentos de la solicitud de Patentes de Invención precedentemente identificada.

A PEDIDO DEL SOLICITANTE Y DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN LA CONVENCION DE PARIS (LISBOA 1958), APROBADO POR LEY 17.011, EXPIDO LA PRESENTE CONSTANCIA DE DEPOSITO EN BUENOS AIRES, REPUBLICA ARGENTINA, a los DIECIOCHO días del mes de mayo de 1999.

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Ing. GERARDO P. BELLOTTI  
COMISARIO  
ADM. NACIONAL DE PATENTES



# Memoria Descriptiva de la Patente de Invención

Sobre

Línea celular productora de Eritropoyetina Humana Recombinante y  
la Eritropoyetina Humana Recombinante producida por esta célula.

Solicitada por

**Bio Sidus S.A.**

Por el plazo de 20 años



Constitución 4234 - 1254  
Buenos Aires - Argentina

LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE Y LA ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE PRODUCIDA POR ESTA CÉLULA



I. Descripción Técnica de la Invención

Una línea celular productora de eritropoyetina (EPO) humana recombinante, y la EPO producida por ésta. Aislamiento y construcción de un gen codificante para EPO, su clonado en plásmidos apropiados para la transfección de células de mamífero. La selección de líneas productoras de EPO, su cultivo y producción de EPO recombinante.

II. Campo Técnico de la Invención

La presente invención se refiere a una línea celular productora de EPO recombinante que incluye una secuencia codificante para EPO con un solo promotor que regula su expresión. La presente invención se refiere también a un método para producir EPO.

III. Estado de la Técnica

La EPO es una glicoproteína que estimula la diferenciación de eritroblastos en la médula ósea, incrementando así el número de eritrocitos en la sangre. La vida promedio de los eritrocitos en humanos es de 120 días, por lo cual un ser humano pierde 1/120 de sus eritrocitos cada día. Esta pérdida debe ser continuamente repuesta para mantener estable la cantidad de glóbulos rojos.

La existencia de la EPO fue postulada desde principio de siglo y fue definitivamente demostrada por Reissman y Erslev a principios de los 50'. Ver Carnot, et al., *C.R. Acad. Sci.*, (Francia), 143, 384-6 (1906); Carnot, et al., *C.R. Acad. Sci.*, (Francia), 143, 432-5 (1906); Carnot, et al., *C.R. Soc. Biol.*, 111, 344-6 (1906); Carnot, *C.R. Soc. Biol.*, 111, 463-5 (1906); Reissman, *Blood*, 1950, 5, 372-80 (1950) y Erslev,



*Blood*, 8, 349-57 (1953). Los experimentos de Reissman y Erslev fueron rápidamente confirmados por otros investigadores. Ver Hodgson, et al., *Blood*, 9, 299-309 (1954); Gordon, et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86, 255-8 (1954) y Borsook, et al., *Blood*, 9, 734-42 (1954).

La individualización del sitio de producción despertó un gran debate. Sucesivos trabajos llevaron a identificar al riñón como el principal órgano y a las células intersticiales peritubulares como el sitio de síntesis. Ver Jacobson, et al., *Nature*, 179, 633-4 (1957); Kuratowska, et al., *Blood*, 18, 527-34 (1961); Fisher, *Acta Hematol.*, 26, 224-32 (1961); Fisher, et al., *Nature*, 205, 611-2 (1965); Frenkel, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 149, 1, 292-3 (1968); Busuttil, et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137, 1, 327-30 (1971); Busuttil, *Acta Haematol.*, (Suiza), 47, 4, 238-42 (1972); Erslev, *Blood*, 44, 1, 77-85 (1974); Kazal, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 5, 2, 98-109 (1975); Sherwood, et al., *Endocrinology*, 99, 2, 504-10 (1976); Fisher, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 28, 101-22 (1988); Jelkmann, et al., *Exp. Hematol.*, 11, 7, 581-8 (1983); Kurtz, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (EE.UU.), 80, 13, 4008-11 (1983); Caro, et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 103, 6, 922-31 (1984); Caro, et al., *Exp. Hematol.*, 12, 357 (1984); Schuster, et al., *Blood*, 70, 1, 316-8 (1986); Bondurant, et al., *Mol. Cell. Biol.*, 6, 7, 2731-3 (1986); Bondurant, et al., *Mol. Cell. Biol.*, 6, 7, 2731-3 (1986); Schuster, et al., *Blood*, 71, 2, 524-7 (1988); Koury, et al., *Blood*, 71, 2, 524-7 (1988); Lacombe, et al., *J. Clin. Invest.*, 81, 2, 620-3 (1988); Koury, et al., *Blood*, 74, 2, 645-51 (1989).

Una proporción menor, de 10% a 15% del total de la EPO, es producida por el hígado en adultos. Ver Naughton, et al., *J. Surg. Oncol.*, 12, 3, 227-42 (1979); Liu, et al., *J. Surg. Oncol.*, 15, 2, 121-32 (1980); Dornfest, et al., *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 11, 1, 37-46 (1981); Dinkelaar, et al., *Exp. Hematol.*, 9, 7, 796-803 (1981); Caro, et al., *Am. J.*

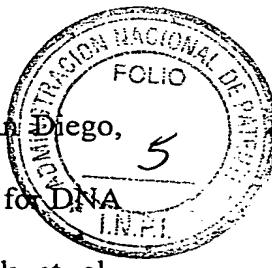


*Physiol.*, 244, 5 (1983); Dornfest, et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 102, 2, 274-85 (1983); Naughton, et al., *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 13, 5, 432-8 (1983); Jacobs, et al., *Nature*, 313, 6005, 806-10 (1985); Erslev, et al., *Med. Oncol. Tumor. Pharmacother.*, 3, 3-4, 159-64 (1986). La EPO se produce proporcionalmente al grado de hipoxia de los tejidos, y su expresión crece mediante el aumento del número de células productoras.

La EPO es una proteína que ha demostrado gran eficacia para el tratamiento de anemias causadas por diferentes factores, en especial la anemia de origen renal. Sin embargo, su disponibilidad terapéutica estuvo limitada hasta hace poco tiempo por la falta de un método de producción masivo, ya que la cantidad y calidad de la EPO obtenida por cualesquiera de los sistemas extractivos conocidos eran insuficientes. Recientemente, el uso de técnicas de ADN recombinante ha viabilizado la obtención de proteínas en grandes cantidades. La aplicación de estas técnicas a células eucarióticas ha permitido la producción a gran escala de EPO. Ver patentes EE.UU. 5.688.679 (Powell), 5.547.933 (Lin), 5.756.349 (Lin), 4.703.008 (Lin) y 4.677.195 (Hewick et al.)

Las técnicas de ADN recombinante son ampliamente conocidas y utilizadas en la actualidad. Las mismas están basadas en el manejo de distintos elementos genéticos que permiten, entre otros usos, armar y transferir construcciones genéticas, y que como consecuencia viabilizan la producción de proteínas recombinantes y el estudio de mecanismos biológicos.

Ver Frank-Kamenetskii, "Unraveling DNA" [Samaia Glavnaia Molekula] (Addison Wesley Longman Inc., Reading, Massachusetts, 1997); Brown, "Gene Cloning" (Chapman & Hall, London, England, 1995); Watson, et al., "Recombinant DNA", 2nd Ed. (Scientific American Books, New York, New York, 1992); Aberts et al., "Biología Molecular de la Célula" (Ediciones Omega, 1990); Innis et al., Eds., "PCR



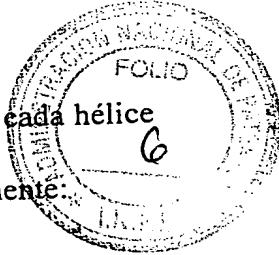
Protocols. A Guide to Methods and Applications" (Academic Press Inc., San Diego, California, 1990); Ehrlich, Ed., "PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification" (Stockton Press, New York, New York, 1989); Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Bishop et al., "Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach" (IRL Press 1987); Reznikoff, Ed., "Maximizing Gene Expression" (Butterworths Publishers, Stoneham, Massachusetts, 1987); Davis et al., "Basic Methods in Molecular Biology" (Elsevier Science Publishing Co., New York, New York, 1986); Watson, "The Double Helix" (Penguin Books USA Inc., New York, New York, 1969)

Una descripción a grandes rasgos de los aspectos de la biología en que se basan las técnicas de ADN recombinante es la siguiente:

El material genético de todas las células vivientes y algunos virus es el ADN (ácido desoxirribonucleico) en forma de cadenas poliméricas compuestas por cuatro nucleósidos diferentes, cada uno de los cuales es una purina o pirimidina ligada a una desoxiribosa que tiene ligado, a su vez, un grupo fosfato. Estos cuatro nucleósidos son: adenina (A); citosina (C); guanina (G); y timina (T).

Las cadenas de ADN se forman por uniones entre los nucleósidos, en las cuales el fosfato de la posición 5' de la desoxiribosa de un nucleótido se une a la posición 3' de la desoxiribosa del nucleótido anterior. La síntesis sucede *in vivo* de 5' a 3', y esta es la dirección en que por convención se describen las secuencias de ADN.

El ADN funcional se presenta como una doble hélice de bases complementarias, en la que las cadenas se mantienen unidas entre sí por los puentes de hidrógeno formados entre las A de una cadena y las T de la otra, y entre las C de una cadena y las G de la otra. Se habla por ello de "pares de bases".



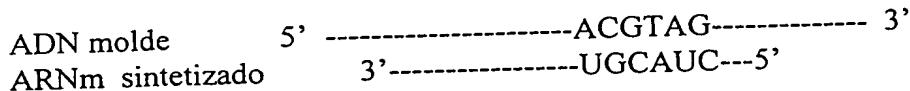
Las cadenas son además antiparalelas, es decir que el extremo 5' de cada hélice se complementa con el extremo 3' de la otra, como se esquematiza seguidamente:

5'---TACGTAG---3'  
3'---ATGCATC---5'

La síntesis celular de proteínas comienza una vez que ciertas regiones del ADN son transcriptas a ARN mensajero, el que es luego traducido a proteína. Cada una de estas regiones de ADN codificantes para una proteína se denomina gen.

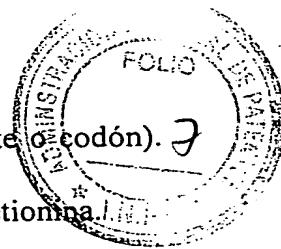
La transcripción consiste en la síntesis de cadenas de ARN (ácido ribonucleico), mediante el copiado por parte de enzimas llamadas ARN polimerasas, de ciertas regiones de los genes que son tomadas como molde. Se obtiene entonces una cadena de ARN antiparalela y complementaria al ADN copiado. A cada A del ADN corresponderá una U en el ARN; a cada C, una G; a cada G, una C y a cada T, una A. Ver Fig. 1. El ARN se diferencia del ADN en que es mucho menos estable, el azúcar que se liga a las purinas y pirimidinas es la ribosa en lugar de desoxirribosa y tiene uracilo (U) en lugar de Timina.

Fig. 1.



Si se trata de células nucleadas, el ARNm sintetizado puede ser procesado en el núcleo (*splicing*) para resultar en ARNm maduro. Este proceso no se verifica en bacterias debido que las mismas no poseen núcleo.

El ARNm maduro es entonces tomado como molde para ser traducido a proteína, en un proceso en el que participan fundamentalmente ARN de transferencia (ARNt, pequeñas cadenas de ARN que transportan aminoácidos y los alinean específicamente para formar la proteína) y ribosomas.

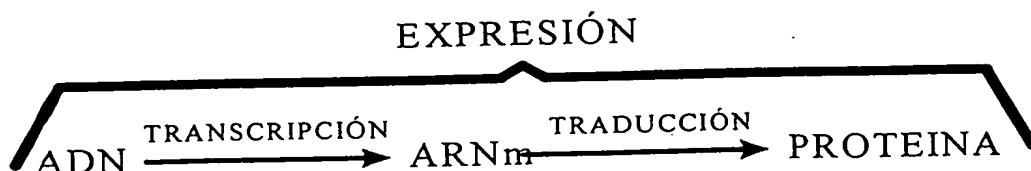


Cada aminoácido está codificado por tres bases del ARNm (tríplete o codón). 3

Por ejemplo, la secuencia AUG en el ARNm corresponde al aminoácido Metionina.

Los nucleótidos de cada ARNm se traducen entonces a una secuencia específica de aminoácidos, es decir a una proteína.

El proceso de transcripción y traducción que resulta en la síntesis de la proteína codificada por el gen, se denomina "expresión de la proteína".



La cantidad de proteína expresada depende, entre otros factores, de ciertas regiones del ADN que se denominan promotores y que influyen en el número de veces que el proceso se lleva a cabo por unidad de tiempo.

Existen también secuencias de ADN que determinan la terminación de la transcripción (terminadores), y codones que determinan el final de la traducción (codones de "stop").

A partir de los primeros años de la década del 70' se desarrollaron las "herramientas" (enzimas de restricción, etc.) y técnicas que dieron origen a la tecnología del ADN recombinante.

En el presente podemos, entre otras aplicaciones de la tecnología, aislar fragmentos de ADN, naturales o no, e insertarlos en células (bacterias, levaduras, células de insecto y de mamíferos, entre otras) para conseguir que las células así modificadas produzcan una proteína heteróloga, como por ejemplo EPO. Las proteínas obtenidas por este proceso se denominan proteínas recombinantes.

El campo de aplicación no está limitado a células en cultivo, ya que los genes pueden ser también incorporados a organismos multicelulares (plantas, insectos, mamíferos y peces, entre otros).

La expresión de proteínas heterólogas requiere básicamente contar con los siguientes elementos:

1. Un gen codificante para la proteína deseada. Puede obtenerse por diferentes tecnologías:

- A. aislamiento a partir de bibliotecas genómicas;
- B. por síntesis *in vitro* de cadenas de ADN. Hay equipos comercialmente disponibles que sintetizan hebras relativamente cortas de ADN, con las que puede "armarse" un gen;
- C. amplificación. Se trata de una tecnología que permite copiar un enorme número de veces un fragmento de ADN que nos interese, por ejemplo un gen;
- D. otros, por ejemplo, a partir de ARN mensajero.

2. Promotores adecuados para expresar la proteína en la célula de interés y en la cantidad y momento deseados.

3. Terminadores adecuados, para que la transcripción sea terminada correctamente.

4. Vectores. Construcciones genéticas que permiten direccionar el gen con su promotor y terminador hacia el interior de la célula que nos interesa, e instalar el gen, ya sea integrado en algún cromosoma o extra-cromosomalmente. Según el sistema empleado, el gen incorporado puede permanecer indefinidamente en la célula y ser transmitido a su progenie, o

perderse en un tiempo más o menos breve. Existen múltiples sistemas de vectores: virus naturales o modificados y plásmidos, entre otros. Incluso pueden usarse medios físicos como la microinyección. Los virus y plásmidos son obtenidos de la naturaleza y modificados genéticamente *in vitro* para lograr las características deseadas.

5. Otros. Adicionalmente pueden ser necesarios otros elementos genéticos para seleccionar por alguna característica las células que recibieron el gen (por ejemplo, otro gen que otorga resistencia a antibióticos) o para conseguir aumentar el número de copias del gen presente en cada célula (amplificación genética), entre otros.

Un sistema ideal de expresión debe utilizar construcciones genéticas simples, de modo que se minimicen los riesgos de obtener sistemas genéticamente inestables o secuencias erróneas que resulten en productos no deseados. El uso de vectores y genes simples reduce el tiempo de desarrollo del sistema.

Una consideración fundamental es que la simplicidad genética no puede ir en desmedro de la productividad ni de la calidad de la proteína producida.

Para lograr la expresión de la proteína deseada, el gen de interés se incluye, mediante procesos de transfección y utilizando vectores adecuados, en el material genético de la célula huésped. La transfección puede realizarse por diferentes técnicas, por ejemplo la electroporación, la precipitación con fosfato de calcio, el uso de liposomas, etc.

El gen de interés puede asociarse a otros genes que son conocidos por conferir resistencia, por ejemplo, a antibióticos como la Geneticina o a agentes tóxicos como el Metotrexato (MTX). Esta asociación permite seleccionar las células transfectadas

ESTRAGOS  
FOLIO 10  
I.N.P.I.

establemente, es decir aquellas que son capaces de reproducir y transmitir el gen de interés a su progenie. La asociación también permite seleccionar las células de mayor productividad.

El producto recombinante obtenido se identifica mediante análisis de su peso molecular, su secuencia de aminoácidos, su actividad biológica, etc.

Las técnicas de ingeniería genética conocidas hasta el presente para la producción de EPO se caracterizan por:

1. Utilizar genes de EPO que incluyen fragmentos de regiones flanqueantes 5' y 3' del mismo gen que no codifican para la proteína. Se considera que la presencia de elementos de control de la expresión ubicados en dichas regiones no codificantes es necesaria y aumenta la producción de EPO. Ver patente EE.UU. 5.688.679.
2. Utilizar vectores de expresión con varios promotores diferentes, fundamentado en que la combinación de promotores induce una mayor producción de EPO. Al presente, el uso de un solo promotor en el vector ha resultado en un bajo de nivel de expresión de la proteína. Ver patentes EE.UU. 4.703.008, 4.677.195 y 5.688.679. La producción promedio de EPO utilizando un solo promotor es de 200 µg/l/día. La producción máxima de EPO informada utilizando un solo promotor es de 10 mg/l/día.
3. La inestabilidad potencial de los sistemas genéticos y por ende de la producción de EPO debido a la complejidad de las construcciones genéticas usadas.



#### IV. Descripción de la Invención

La invención reivindicada consiste en una línea celular eucariótica productora de EPO humana recombinante, obtenida a través de la transfección con un vector de expresión que incluye un gen codificante para EPO humana, un único promotor y un terminador como elementos de control de la expresión. SEC 1 identifica la secuencia de aminoácidos de EPO para la que codifica el gen utilizado.

Una de las ventajas de la presente invención es que el gen codificante para EPO utilizado no incluye fragmentos de regiones flanqueantes 5' y 3' del gen de EPO que no codifican para la proteína. Aún así, el sistema reivindicado produce gran cantidad de EPO.

Una ventaja adicional de la presente invención es la producción de grandes cantidades de EPO mediante el uso de vectores de expresión con un solo promotor. Mediante el método reivindicado se obtienen más de 50 mg de EPO por litro de cultivo por día, o sea más de cinco veces la producción de EPO reclamada por los métodos conocidos.

La combinación del gen codificante para EPO utilizado en esta invención y un promotor simple demostró, sorpresivamente, funcionar con gran eficiencia, obteniéndose células establemente transfectadas que producen cantidades de EPO comparables o superiores a las reportadas usando construcciones genéticas teóricamente más adecuadas, pero mucho más complejas y difíciles de manejar en la práctica.

Una ventaja adicional de la invención reivindicada es la cotransfección con dos vectores que confieren resistencias diferentes, facilitando la selección, amplificación genética y mantenimiento de las células productoras cotransfектadas.

Para obtener la línea celular objeto de la invención reivindicada, se prepara, primeramente, ADN genómico extraído de glóbulos blancos humanos. El gen codificante para EPO se obtiene a partir del ADN preparado. Para ello el gen se

FOLIO  
12

amplifica utilizando *primers* que evitan la presencia regiones flanqueantes 5' y 3' del gen de EPO que no codifican para la proteína. Estos *primers* incluyen en su extremo 5' sitios de restricción, que quedan entonces insertados a ambos extremos del gen aislado y facilitan los clonados subsiguientes.

Posteriormente, se clona el gen amplificado en un vector bacteriano y se procede a su secuenciación. Una vez comprobada la secuencia obtenida, se clona el gen en los sitios Xho I-Hind III de un vector de expresión para células eucarióticas que utiliza, para controlar la expresión, sólo el promotor temprano de SV 40 y su terminador. El vector confiere resistencia a Geneticina y a Ampicilina.

Luego se cotransfieren células CHO con el vector de expresión obtenido y un segundo vector que confiere resistencia a Metotrexato.

Entonces se seleccionan las células transfieridas establemente por su resistencia a Geneticina y se amplifica la expresión de EPO seleccionando las células resistentes a cantidades crecientes de Metotrexato.

Finalmente, se eligen clones de acuerdo a su productividad medida por RIE. Los sobrenadantes de cultivo de los clones más productivos se utilizan para comprobar la identidad de la EPO producida y su actividad biológica mediante pruebas SDS-PAGE, "Western Blot", tratamiento con glicanasas seguido de SDS-PAGE, isoelectroenfoque, secuencia completa de la proteína y actividad biológica *in vivo* en ratones policitómicos *ex* hipóxicos comparada con el estándar internacional de EPO.

Los procesos enumerados se realizan siguiendo técnicas de biología molecular que se ejemplifican como sigue.

#### EJEMPLO 1. PREPARACIÓN DE ADN GENÓMICO HUMANO

Se extrajeron 10 ml de sangre en 10 mM EDTA pH 8 de un individuo adulto de sexo masculino y clínicamente sano. Se transfirió en alícuotas de 5 ml a dos tubos de 50 ml y se agregaron, en cada uno, 45 ml de una solución de 0,3 M sacarosa, 10 mM Tris-

FOLIO 13

HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 % Tritón X 100, mantenida a 4°C.

Se dejó reposar en hielo por 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 1.000 g y 4°C, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó varias veces con una solución 0,075 M NaCl y 0,025 M EDTA pH 8, centrifugando cada vez 10 minutos a 1.000 g y 4 °C.

Se resuspendió en 3 ml de una solución 10 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8; se agregaron entonces 200 µl de 10 % SDS (dodecilsulfato de sodio) y 500 µl de proteinasa K (1 mg/ml en 1% SDS y 2 mM EDTA pH 8), y se incubó durante una noche a 37 °C.

Luego de esta incubación, se agregó 1 ml de solución saturada de NaCl y luego de agitar se centrifugó a 2.500 g por 15 minutos.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 15 ml donde se duplicó el volumen mediante el agregado de isopropanol. Se mezcló suavemente por inversión del tubo y se dejó a temperatura ambiente hasta que se formó un precipitado de ADN que fue "pescado" con una pipeta Pasteur de vidrio doblada.

Se colocó el ADN en un tubo de 2 mL y se agregó 1 mL de etanol 70 %, se dejó durante un minuto, y luego se descartó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado para disolverlo luego en 500 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8 - 1 mM EDTA).

Se calculó la concentración de la solución de ADN midiendo a 260 nm la absorbancia de una dilución 1:1000 de esta solución; por cada unidad de densidad óptica se consideró tener 50 µg de ADN genómico. Conocida la concentración se preparó una solución con 500 ng de ADN genómico/µl en TE.

#### EJEMPLO 2. AISLAMIENTO DEL GEN CODIFICANTE PARA EPO

Se preparó el gen codificante para EPO a partir de 500 ng del ADN genómico humano obtenido en el ejemplo 1, con 400 ng de cada uno de los *primers* EPO 1 y EPO 2; en una solución acuosa 2,5 mM en cada deoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), con 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Perkin-Elmer) en un volumen final

FOLIO  
11

de 100  $\mu$ l, utilizando el buffer recomendado por el fabricante. Se utilizó un equipo *Thermal Cycler 480* de Perkin Elmer - Cetus que se programó para 30 ciclos de 1 minuto a 93 °C, 1 minuto a 55 °C y 3 minutos a 72 °C. De la reacción se obtuvo un fragmento de aproximadamente 2.170 pares de bases conteniendo el gen de EPO.

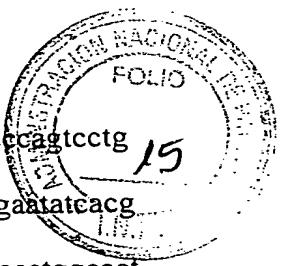
La secuencia de los oligonucleótidos empleados fue :

**EPO 1:** 5' GAATTCTCGAGATGGGGGTGCACGGTGAG 3' (SEC 2) que corresponde a las primeras bases que son traducidas del gen de la EPO con el agregado en su extremo 5' de un sitio de reconocimiento para la enzima Xho I y uno para Eco RI, que son utilizados en los clonados posteriores.

**EPO 2:** 5' AAGCTTCATCTGTCCCCGTGCCTGCA 3', (SEC 3) que es complementario a las últimas bases traducidas y a algunas de la parte 3' no codificante del gen de la EPO, tiene agregado en su extremo 3' un sitio de reconocimiento para la enzima Hind III para ser usado en clonados posteriores.

La secuencia obtenida es la siguiente (SEC 4):

*gaattctcgagatgggggtgcacggtgagtactcgccggctggcgctccgcgcgggtcccttgtttagcgccggctatggccaggaggtggctgggtcaaggaccggcgacttgtcaaggaccggagaagggggagggggtagggcagccacgtgccagcgggacttggggagtcctgggatggaaaaacctgacctgtgaaggggacaca*  
*gtttggggttgagggagaagaaggttgggttctgtgtccagtggagaggaagctgataagctgataaccctggcgctggagccaccattatgtccagagggaaagcctctgacaccaggattgaagttggccggagaagtggatgctggtagctgggggtgggtgtgcacacggcagcaggattgaatgaaggccaggaggcagcacctgagtgcttgcattggatggaca*  
*ggaaggacgagctgggcagagacgtgggatgaaggaagctgtccacagccacccttcccccgcctgactc*



tcagcctggatatctgttctagaatgtcctgcctggctgtggcttcctgtccctgtcgctcccttggcccccagtcctg  
ggcgc(ccaccacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagaggtaaccttggaggccaaggaggccgagaatacag  
gtgagacccctccccagcacattccacagaactcagcgtcaggcgtcagggaactcccccagatccaggaacctggcact  
tggtttgggtggagttggaaagctagacactgccccctacataagaataagtctgggtggcccaaaccatactggaaact  
aggcaaggagcaaagccagcagatcctacggcgtgcccagggccagagccctcagggaccctgactccccggcgt  
tgtgcattcagacggcgtgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatcactgtcccagacaccaaagttatctatgcctg  
gaagaggatggaggtgagttcccttt  
tgatcggggaaaggtaaaatggagcagcagagatgaggctgcctggcgcagaggctacgtctataatcccaggcgtga  
gatggccgagatgggagaattgttgcagccctggagttcagaccaacctaggcagcatgtgagatccccatctacaaa  
cattaaaaaaaaatttcaggtgaagtggtgcatt  
cccaaaaaatttgggctgcagtgtgatcacaccactgcactccagcctcagtgacagagtgaggccctgtctaaaaaa  
agaaaaagaaaaagaaaaataatggggctgttatggaaatacatttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
attcaacaagtcttattgcataccctctgtttgtcagcttgcatttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
ggtcagctgactccagactccactccctgttaggtcggcagcaggccgtagaagtctggcagggcctggccctgtctg  
gaagctgtcctgcggggccaggccctgtttgtcaactctccagccgtggagccctgcagctgcatttttttttttttt  
tcagttggccttcgcagccaccactctgttcggctctggagccaggtaactgtccgtattccctccctgtggactgc  
tgtaaaggggagaagggtttgtctaaggagttacaggaactgtccgtattccctccctgtggactgcagcgcacccct  
gttttctccctggcagaaggaagccatctccctccagatgcggccctcagctgcactccgaacaatcactgtgacactt  
cgccaaactctccagacttccaaatttcctccggggaaagctgaagctgtacacagggaggcctgcaggacaggggaca  
gatgaaagctt

El primer codón atg traducido, así como el codón tga de "stop", están subrayados. Las secuencias de sitios de restricción usados para el clonado aparecen en negrillas itálicas.

### EJEMPLO 3. CLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL GEN AISLADO

El fragmento de aproximadamente 2.170 bases correspondiente al gen de la EPO, fue purificado, hechos sus extremos romos por tratamiento con el fragmento de

FOLIO 16

Klenow de la ADN polimerasa y clonado en el sitio Sma I de un vector M13mp18 siguiendo técnicas estándar aplicadas en biología molecular. Los plasmidos recombinantes obtenidos se cortaron con las enzimas Xho I e Hind III, se comprobó la presencia del inserto por electroforesis del producto de los cortes de restricción en un gel 0,8 % de agarosa revelado por tinción con bromuro de etidio. Se eligió un clon positivo (dos bandas, una de alrededor de 2.200 pares de bases y otra correspondiente al vector linearizado) y secuenció siguiendo la técnica de Sanger en forma manual utilizando "T7 sequencing kit" (Pharmacia) y con el uso de un secuenciador automático 370 A de Applied Biosystems International, siguiendo para cada sistema de secuenciación los protocolos recomendados por los fabricantes.

#### EJEMPLO 4. VECTORES PARA CÉLULAS EUCARÍÓTICAS

##### A. Construcción del Vector pVex 1

Se construyó siguiendo las técnicas usuales de biología molecular. Consiste en:

- a) fragmentos del vector bacteriano pBR322, que aportan un origen de replicación bacteriana y resistencia a ampicilina, para amplificación y selección del vector en *E. coli*.
- b) inmediatamente a 3' de a) se encuentra el promotor temprano de virus SV40, permite conseguir expresión de los genes clonados a 5' de este elemento.
- c) inmediatamente a 3' de b) siguen sitios de clonado Xho I e Hind III, para insertar los genes a expresar.
- d) inmediatamente a 3' de c) se halla la señal de poliadenilación de virus SV40, para obtener la correcta poliadenilación de los transcriptos específicos del gen clonado en c).
- e) inmediatamente a 3' de d) se encuentra el promotor TK y el gen codificante de neomicina fosfotransferasa más su señal de poliadenilación, para permitir seleccionar las células establemente transfectadas mediante selección por



resistencia a la neomicina y antibióticos derivados de ésta como la geneticina. El extremo 3' de e) está ligado al extremo 5' de a).

Un especimen del vector pVex 1 se encuentra depositado en la Asociación Banco Argentino de Células, núm. depósito ABAC-P-001.

#### B. Vector pDHFR

El vector pDHFR confiere resistencia a ampicilina para su selección en bacterias e incluye el ADN copia codificante para dehidrofolatoreductasa (DHFR) de ratón, cuya expresión está controlada por el promotor temprano de virus SV40 y su señal de poliadenilación.

La coexpresión de DHFR y el gen codificante para EPO permite, mediante la selección con agregado de metotrexate (MTX) en el medio de cultivo, amplificar un cierto número de veces la expresión de EPO lograda con el vector pVex 1-EPO.

Un especimen del vector p DHFR se encuentra depositado en la Asociación Banco Argentino de Células, núm. depósito ABAC-P-002.

#### EJEMPLO 5. CLONADO DEL GEN CODIFICANTE PARA EPO EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN

El gen secuenciado fue extraído escindiéndolo con las enzimas Xho I - Hind III del vector en el que se lo clonó en el ejemplo 3. Fue entonces aislado y clonado en los mismos sitios de restricción del vector pVex 1. Se aisló un clon positivo pVex-EPO.

Todas estas operaciones se llevaron a cabo siguiendo las técnicas tradicionales de ingeniería genética. Ver Brown, "Gene Cloning" (Chapman & Hall, London, England, 1995); Watson, et al., "Recombinant DNA", 2nd Ed. (Scientific American Books, New York, New York, 1992); Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Bishop et al., "Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach" (IRL Press 1987); Davis et al., "Basic Methods in Molecular Biology" (Elsevier Science Publishing Co., New York, New York, 1986)



## EJEMPLO 6 . COTRANSFECCIÓN Y AMPLIFICACIÓN CON MTX

Se utilizó una línea celular CHO (*Chinese Hamster Ovary*), de ovario de hamster, mutada para ser deficiente en el gen de la enzima DHFR (CHO-DHFR-), en modo de facilitar la amplificación genética con MTX.

Durante todo el proceso las células se crecieron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Se cotransfectaron células CHO; para ello se siguió la técnica del fosfato de calcio que, para una caja de Petri de 90 mm de diámetro, consiste en :

- a) Cambiar el medio de cultivo, que es alfa-MEM adicionado con 10 % de suero fetal bovino, por medio fresco 4-8 horas antes de la transfección.
- b) Agregar a un tubo de 5 ml, 500 µl de una solución 10 gr/l HEPES de pH 7,1; 16 gr/l NaCl y 10 µl de una solución 35 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 35 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- c) Preparar en otro tubo de 1,5 ml una solución con 60 µl de 2 M CaCl<sub>2</sub> y 10 µg de cada ADN a transfectar (pVex-EPO y pDHFR), llevando a 500 µl con H<sub>2</sub>O. El plásmido pDHFR que se describe en el ejemplo 2 está basado en pBR 322, confiere resistencia a ampicilina, puede replicarse en *E. coli*, tiene clonado el gen de DHFR entre el promotor temprano y el terminador de SV40, y permite la expresión de la proteína DHFR en las células CHO. Esta proteína confiere resistencia a Metotrexato, el que puede ser usado entonces para seleccionar células que poseen alta productividad de EPO.
- d) Agregar al tubo con Hepes la solución de ADN y CaCl<sub>2</sub> gota a gota mientras se burbujea aire para conseguir un mezclado veloz y que las concentraciones locales sean lo más pequeñas posibles, lo que posibilita la formación de un precipitado muy fino que es incorporado más eficientemente por las células.
- e) Dejar reposar 30 minutos y luego verter sobre las células.



- f) Distribuir bien, agitando suavemente, y dejar toda la noche en incubador a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5%.
- g) Lavar 2 veces con PBS (8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,44 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, llevado a 1 litro con H<sub>2</sub>O y a pH 7,4 con HCl y agregar medio de cultivo fresco.

Veinticuatro horas después de la transfección se comenzó a seleccionar con Geneticina (G 418) en una concentración final de 600 µg/ml. Las células que incorporaron establemente el plásmido pVex-EPO fueron capaces de resistir el antibiótico mientras todas las demás habían muerto al cabo de 25 días. Se separaron colonias resistentes y se ensayó su productividad. Una vez aislados los clones se eligieron los tres de mejor productividad.

Aprovechando las construcciones genéticas utilizadas en la invención se hizo con cada uno de los tres clones una selección con un segundo agente selectivo: MTX a diferentes concentraciones : 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-5</sup> M. Para ello se cambió el medio de cultivo a alfa-MEM sin nucleósidos, suplementado con 10 % de suero fetal bovino dializado. Es un factor crítico que la diálisis se lleve a cabo según el siguiente esquema: para 100 ml de suero se coloca el suero en una bolsa de diálisis de porosidad menor a 3.000 Da (una porosidad mayor haría perder factores de crecimiento con lo cual las células no podrían crecer y reproducirse), se cierra la bolsa herméticamente y se sumerge completamente en un recipiente con 5 litros de agua bidestilada, se deja a 4 °C durante 12 horas; a las 12 horas se descarta el agua y se agregan otros 5 litros; se deja otras 12 horas a 4 °C y luego se saca la bolsa de diálisis y se recupera el suero. Dializar durante períodos más cortos, o en volúmenes más pequeños, o sin cambiar el agua no serviría, ya que una pequeña proporción de nucleótidos podría quedar en el suero, con lo que la selección con MTX no funcionaría. Dializar por periodos más largos tampoco serviría ya que algunas proteínas, necesarias para el crecimiento de las células podrían

precipitar y perderse.

#### EJEMPLO 7. AISLAMIENTO DE CLONES DE ALTA PRODUCTIVIDAD

Los clones que crecieron en  $10^{-7}$  M y  $10^{-6}$  M de MTX fueron aislados amplificados en medio fresco alfa-MEM sin nucleósidos suplementado con 10 % de suero fetal bovino dializado. Una vez crecidos se ensayó el sobrenadante de cultivo para medir la producción y secreción de EPO. Para ello, se usó un inmunoensayo específico.

El proceso descrito anteriormente concluyó con la selección de un clon de células recombinantes que producía 50.000  $\mu\text{g}$  de EPO/litro de medio de cultivo/día.

Un especímen de las células recombinantes utilizadas se encuentra depositado en la Asociación Banco Argentino de Células, núm. depósito ABAC-L-200.

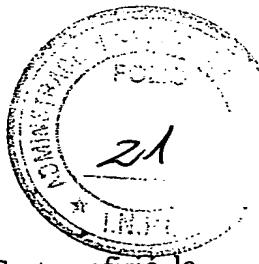
Para comprobar que no existiesen errores en la secuencia del gen utilizado o en su transcripción, se controlaron los transcriptos celulares específicos de EPO como se describe en el ejemplo 8. Para identificar la proteína obtenida se procedió como se describe en el ejemplo 9.

#### EJEMPLO 8. VERIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DEL ARN MENSAJERO ESPECÍFICO PRODUCIDO POR LAS CÉLULAS RECOMBINANTES

##### A. Preparación de ARN de Células

Se preparó ARN total a partir de una de las líneas productoras según el siguiente protocolo:

- a) Se lavó 2 veces con 10 ml de PBS una caja de Petri de 90 mm de diámetro con células confluentes.
- b) Se agregaron 2 ml de *buffer* GTC, distribuyéndolo por toda la placa. El *buffer* GTC se compone de:
  - 1) 50 gr de tiocianato de guanidinio
  - 2) 0,5 gr de N-Lauroilsarcosina
  - 3) 2,5 ml de citrato de sodio 1 M pH 7



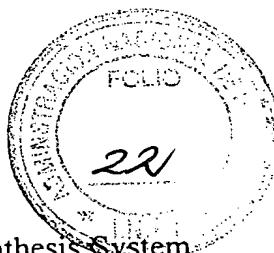
- 4) 0,7 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol
- 5) 0,33 ml de 30 % antiespuma (SIGMA)
- 6)  $H_2O$  c.s.p. 100 ml, pH 7,0

Las células se lisaron y quedó una solución altamente viscosa. Se transfirió la solución a un tubo de 15 ml, y se repitió la operación con otros 2 ml de *buffer GTC*.

a) Se agitó el tubo enérgicamente, durante 1 minuto, para romper el ADN. Se realizó un fraccionamiento en gradiente de cloruro de cesio. Para ello, se colocó en un tubo de ultracentrífuga, 4 ml de solución de CsCl (95,97 gr CsCl y 2,5 ml de Na Acetato 1 M pH 5,4 llevado todo a 100 ml con  $H_2O$ ). Sobre éste y sin mezclar, se agregó la suspensión de las células en GTC, llenando el tubo con *buffer GTC* y ultracentrifugando a 20 °C, 20 horas a 31.000 rpm.

- b) En estas condiciones, el ARN quedó en el fondo del tubo (*pellet*) y el ADN formó una banda que quedó a mitad del gradiente de cloruro de cesio.
- c) Se descartó el sobrenadante, cuidando de eliminar todo el ADN y dejando secar el ARN, en el *pellet*, por 5 minutos.
- d) Se disolvió el *pellet* en 200  $\mu l$  de  $H_2O$  y se transfirió a un tubo de 1,5 ml.
- e) Se agregaron 200  $\mu l$  de 0,4 M Na Acetato pH 4,8 y dos volúmenes de etanol, mezclando bien y dejando 30 minutos a -80 °C.
- f) Se centrifugó en microcentrífuga a 14.000 rpm por 15 minutos, descartando el sobrenadante y enjuagando el precipitado con 1 ml de etanol 80 %.
- g) Se secó y redisolvió el *pellet* en 100  $\mu l$  de  $H_2O$ .
- h) Se midió la concentración de una dilución 1:100 de la solución de ARN, a 260 nm (una unidad de densidad óptica equivale a 40  $\mu g$  de ARN).

**Nota :** Todas las soluciones y elementos utilizados estuvieron libres de ARNasa.



### B. Preparación de ADNc específico

Se preparó el ADNc específico con un *kit* para tal fin (cDNA Synthesis System Plus, Amersham - cat. RPN 1256) siguiendo sus instrucciones y usando el oligonucleótido EPO 2 como *primer* específico.

### C. Clonado del ADNc Codificante Para EPO

Se amplificó 1/20 del ADNc obtenido, usando 400 ng de cada uno de los oligonucleótidos EPO 2 y EPO 3 y 2,5 mM de cada deoxinucleótido, en el *buffer* adecuado y con 2,5 Unidades de Taq ADN polimerasa, en 100 µl totales.

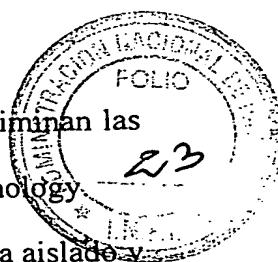
Se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación de: 1 minuto a 93 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C.

EPO 3 fue sintetizado como ya fue descrito para EPO 1 y EPO 2, y su secuencia (5' GAATTCCATGGGGGTGCACGAATGTCC 3') corresponde a las primeras 20 bases codificantes del ADNc de EPO, con el agregado de un sitio de reconocimiento para la enzima Eco RI, para facilitar las manipulaciones genéticas posteriores.

Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases, que fue clonado en vectores M13mp18 y M13mp19.

Se ensayó la presencia del inserto en los clones con cortes de restricción y se secuenció en ambas direcciones para conocer la secuencia completa, usando el método de Sanger.

Dada la altísima autocomplementariedad que poseen regiones del gen, lo que provoca la aparición de muchas y muy ambiguas compresiones en la radioautografía, fue necesario utilizar un *kit* de secuencia que utiliza Taq ADN polimerasa y bases



modificadas, con lo que se obtienen resultados de menor calidad pero que eliminan las compresiones. El *kit* empleado fue el *Gene aTaq* de Pharmacia-LKB Biotechnology.

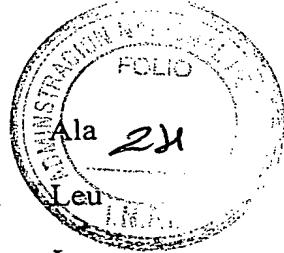
La secuenciación completa de bases del ADN copia de la EPO humana aislada y clonado mostró que codifica para EPO, por lo que no hay errores en el gen presente en las células CHO recombinantes o en su transcripción.

#### EJEMPLO 9. ANÁLISIS DE LA EPO PRODUCIDA

La EPO obtenida cultivando las células del presente ejemplo fue llevada a pureza y luego sometida a diferentes estudios de calidad e identificatorios:

- a) En un gel desnaturalizante SDS-PAGE corrió como una banda ancha de alrededor de 30 kDa de peso molecular. Ver Fig. 1.
- b) Esa banda fue reconocida por un anticuerpo monoclonal así como por un anticuerpo policlonal contra EPO humana en un ensayo "Western Blot". Ver Fig. 2.
- c) El tratamiento con glicanasas probó la existencia de las cadenas glicosídicas en cantidad y peso molecular acorde a lo esperado. Ver Fig. 3.
- d) La EPO producida mostró estar compuesta por una serie de especies de punto isoeléctrico comprendido entre 3,0 y 4,5. Ver Fig. 4.
- e) La secuenciación completa de aminoácidos de la proteína aislada y purificada a partir del sobrenadante de cultivo de las líneas celulares transfectedas mostró total homología con la EPO humana natural que posee la siguiente secuencia de 165 aminoácidos (SEC 1).

NH <sub>2</sub> —Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg
Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys
Glu	Ala	Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala
Glu	Hys	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr
Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala



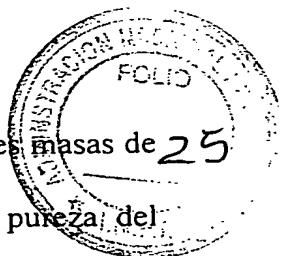
Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Leu	Leu
Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu
Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Ala	Leu	Leu
Leu	Val	<u>Asn</u>	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro		
Leu	Gln	Leu	Hys	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser		
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg		
Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser		
Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	<u>Ser</u>	Ala	Ala	Pro	Leu		
Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys		
Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg		
Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala		
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	—COOH						

#### X sitios de glicosilación

- f) La presencia de los cuatro sitios de glicosilación sobre la cadena de 165 aminoácidos así como la estructura de hidratos de carbono, fundamentalmente los residuos de ácido siálico terminales, fueron demostrados conjuntamente con su correcta actividad biológica *in vivo*, en el modelo de ensayo del ratón policitémico ex-hipóxico, exhibiendo total paralelismo frente al estándar internacional correspondiente.
- g) La productividad alcanzada medida por un inmunoensayo específico fue de 50 mg/litro de cultivo/día.

#### V. Descripción de Diagramas

La Fig. 1 ilustra un análisis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de una muestra de la EPO obtenida según el método descrito. En las calles 1, 4 y 7 se ven los



marcadores de peso molecular. En las calles 2, 3, 5 y 6 se corrieron diferentes masas de EPO pura obtenida según el proceso reivindicado. Puede apreciarse la pureza del producto obtenido y su peso molecular aparente de algo más de 30 kDa que coincide con el de la EPO humana urinaria.

La Fig. 2 ilustra un análisis "Western Blot" de una muestra de la EPO obtenida según el método descrito. Se verifica la identidad de la EPO producida, ya que es reconocida por un anticuerpo antiEPO humana. En la calle 1 se corrió un estándar de EPO humana, en la calle 2 marcadores de peso molecular y en las calles 3 a 5 muestras de EPO obtenidas según el método reivindicado.

La Fig. 3 ilustra un análisis SDS-PAGE de una muestra de EPO pura obtenida según el método descrito, tratada con glicanasas. Los marcadores de peso molecular se corrieron en las calles 1, 4 y 8. En las calles 2 y 7 se ve EPO sin tratar. En la calle 3 se corrió EPO tratada con O-glicanasa, se verifica la presencia de una O-glicosilación. En la calle 5 se corrió EPO parcialmente degradada con N-glicanasa, se verifica la presencia de 3 N-glicosilaciones con los pesos moleculares correspondientes a los esperados para la EPO. En la calle 6 se corrió EPO degradada con O-glicanasa y N-glicanasa, obteniéndose el peso molecular esperado para la proteína totalmente deglicosilada.

La Fig. 4 ilustra un estudio de los puntos isoeléctricos de muestras de EPO pura producidas según el método descrito. Las muestras de EPO se corrieron en las calles 2, 3 y 4, los marcadores de punto isoeléctrico en las calles 1 y 5. Se verifica la presencia de las formas correspondientes a EPO, con puntos isoeléctricos comprendidos entre 3,0 y 4,5.

VI. Reivindicaciones

26

Habiendo descrito y exemplificado la naturaleza y objeto principal de la presente invención, así como también la manera en que la misma se puede llevar a la práctica. Se declara reivindicar como de propiedad y de derechos exclusivos:

1. UNA LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE caracterizada porque: a) El gen codificante para EPO es el detallado en SEC 4 y consiste sólo de la parte codificante del gen humano de EPO, sin incluir secuencias de regiones flanqueantes 5' y 3' del gen de EPO que no codifican para la proteína, b) las construcciones genéticas utilizadas poseen, como elementos de control de la expresión de EPO, un único promotor y terminador viral, c) el método de construcción del gen codificante para EPO utiliza ADN humano como material de partida.
2. UNA LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE según la reivindicación 1, caracterizada porque los sistemas genéticos de expresión consisten de dos vectores que poseen como elementos de control de la expresión de EPO sólo el promotor temprano de virus SV40 y su terminador.
3. UNA LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE según la reivindicación 1, caracterizada porque los sistemas genéticos de expresión consisten de dos vectores que poseen como elemento de control de la expresión de EPO el promotor temprano de virus SV40.
4. UNA LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende un vector pDHFR.
5. UNA LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE según la reivindicación 1, caracterizada porque

27

las líneas celulares se seleccionan utilizando un doble sistema, I) resistencia a la  
geneticina y II) resistencia a cantidades crecientes de Metotrexato,

6. UNA LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA  
HUMANA RECOMBINANTE según la reivindicación 1, caracterizada porque  
la EPO obtenida consiste de 165 aminoácidos según la siguiente secuencia:

NH <sub>2</sub> —Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg
Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys
Glu	Ala	Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala
Glu	Hys	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr
Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala
Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala
Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu
Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu
Leu	Val	<u>Asn</u>	Ser	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro
Leu	Gln	Leu	Hys	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg
Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser
Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	<u>Ser</u>	Ala	Ala	Pro	Leu
Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys
Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg
Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	COOH				

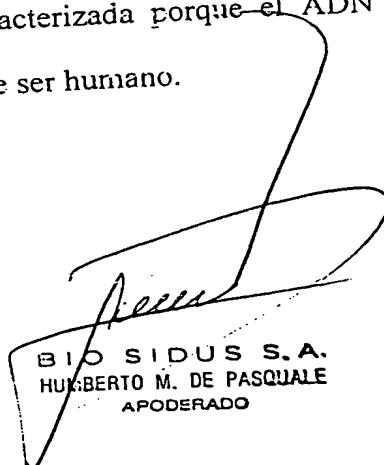
X sitios de glicosilación

7. UNA LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA  
HUMANA RECOMBINANTE según la reivindicación 1, caracterizada porque

produce cantidades sorprendentemente altas de EPO, mayores que 50 mg/litro  
de medio de cultivo/día.



8. LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE según la reivindicación 1, caracterizada porque las células son células de mamífero.
9. LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE según la reivindicación 1, caracterizada porque las células son células CHO, COS, BHK, Namalwa, HeLa, Hep3B, HepG2 u otras células de mamífero
10. LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE según la reivindicación 1, caracterizada porque las células son células CHO o COS.
11. LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE según la reivindicación 1, caracterizada porque las células son células CHO.
12. LÍNEA CELULAR PRODUCTORA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE según la reivindicación 1, caracterizada porque el ADN genómico utilizado se obtiene de glóbulos blancos de ser humano.



VII. Diagramas

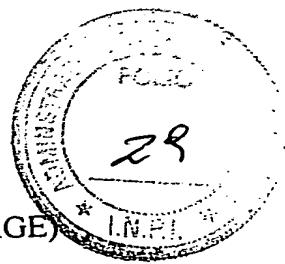


Fig. 1. Análisis por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

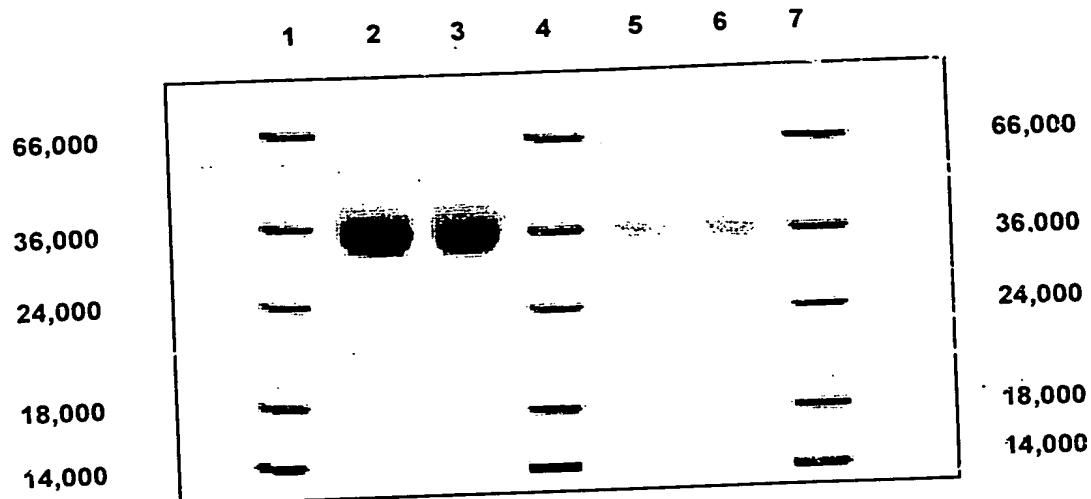
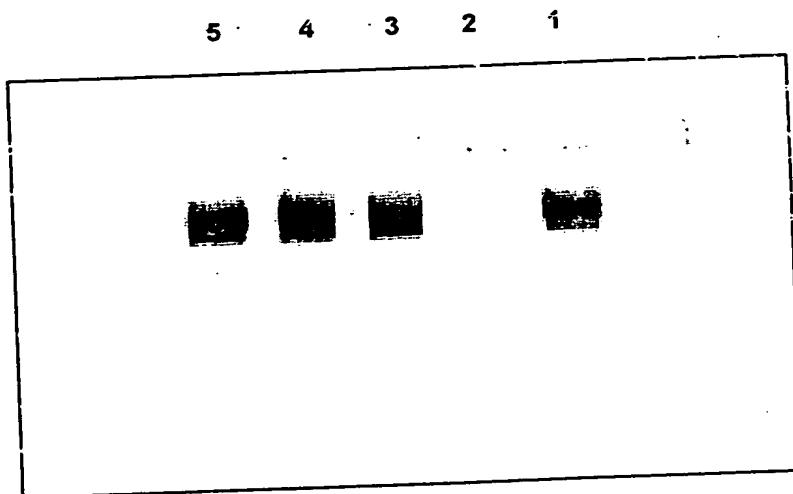


Fig. 2. Análisis "Western Blot"



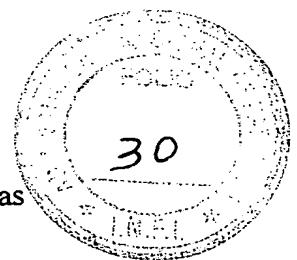


Fig. 3. Análisis por SDS-PAGE de la Digestión de EPO con Glicanasas

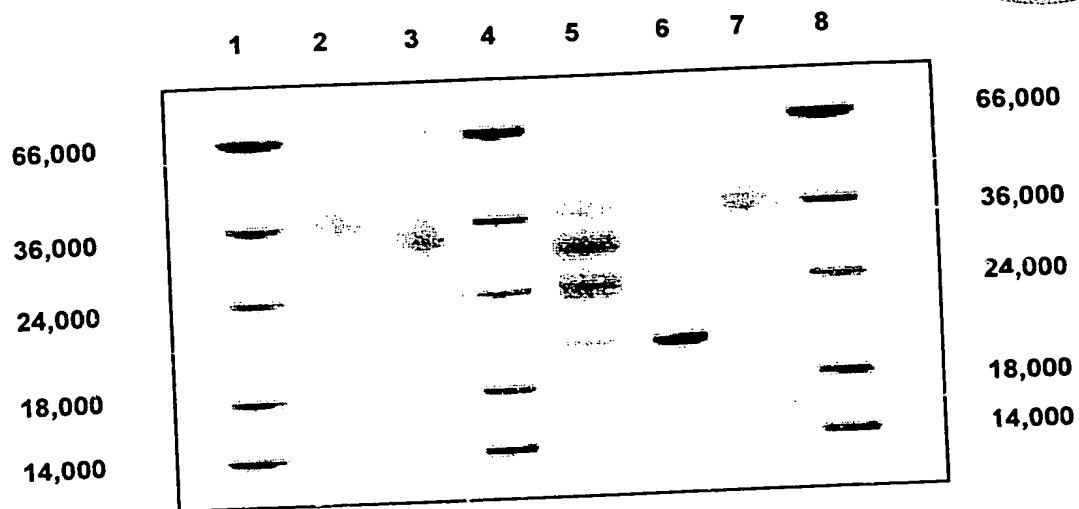
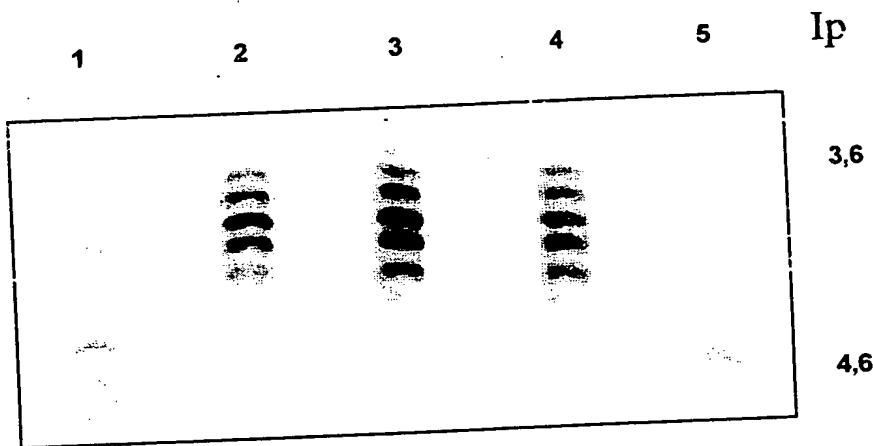


Fig. 4. Determinación de Punto Isoeléctrico (Isoelectroenfoque)



VIII. Déposito de Microorganismos

El vector pDHFR fue depositado el 2 de febrero de 1999 en el banco de células de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC) bajo el código de acceso ABAC-P-002.

El vector pVex 1 fue depositado el 2 de febrero de 1999 en el banco de células de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC) bajo el código de acceso ABAC-P-001.

La línea celular recombinante reivindicada fue depositada el 2 de febrero de 1999 en el banco de células de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC) bajo el código de acceso ABAC-L-200.



## IX. Resumen

El gen codificante para eritropoyetina humana (EPO) se obtuvo a partir de ADN genómico humano. El gen utilizado no incluye fragmentos de regiones flanqueantes 5' y 3' del gen de EPO que no codifican para la proteína. El gen fue clonado en un plásmido de expresión para células eucarióticas que tiene como únicos elementos de control de la expresión al promotor temprano de virus SV40 y su señal de poliadenilación. Las células recombinantes resultantes de la transfección con las contrucciones genéticas utilizadas produce inesperadamente más de 50 mg de EPO recombinante por litro de medio de cultivo y por día.

*THIS PAGE BLANK (USPTO)*